

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. ⁷
C12N 15/00

(11) 공개번호 특2001- 0083976
(43) 공개일자 2001년09월06일

(21) 출원번호 10- 2000- 0008673
(22) 출원일자 2000년02월23일

(71) 출원인 한국원자력연구소
장인순
대전 유성구 덕진동 150번지

(72) 발명자 유영도
서울특별시강남구대치동은마아파트6- 1401
강성욱
경기도수원시장안구정자동동신아파트101- 102
박종국
서울특별시강동구압사1동491- 26
정영민
서울특별시노원구공릉3동371- 11경남연립가동106호
박선희
서울특별시서대문구홍제동홍제원현대아파트109- 40
이영경
서울특별시동대문구장안2동장안@2단지77- 405
이승훈
서울특별시노원구공릉2동원자력병원세포생물학연구실

(74) 대리인 최규팔

심사청구 : 있음

(54) 인간 페록시레독신 II 안티센스 서열을 포함하는 방사선증감제

요약

본 발명은 항산화 효소 기능을 갖는 인간 페록시레독신 II(peroxiredoxin II; 이하, Prx II라고 부름) 유전자의 안티센스 염기 서열을 포함한 방사선 증감제 및 방사선 치료에 있어서 이것의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따라 Prx II 안티센스 서열을 포함하는 플라스미드를 두경부암, 유방암 등의 암세포에 처리한 후, 방사선을 조사하였을 경우 67% 이상의 암세포 살상 효과가 나타났다.

대표도
도 5

색인어

페록시레독신, 방사선 내성, 방사선 증감제, 안티센스, 항산화제 단백질

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 화학요법제/방사선 조사 감수성 두경부암 조직 또는 방사선 조사 내성 두경부암 조직에서 Prx II의 발현 결과도. N= 정상 조직; 2- 5= 방사선 요법 감수성 종양(방사선 치료후 퇴화한 종양); 6- 9= 방사선 요법 내성 종양.

도 2는 방사선 조사후 Prx II 단백질의 유도 여부를 나타내는 웨스턴 블롯 결과도. 11A(A)는 두경부암 세포이고, MCF- 7(B)은 유방암 세포.

도 3은 Prx II- 과발현 MCF- 7 세포에서 방사선조사 후 세포 생존율을 나타내는 그래프도. A: Prx II- 과발현 형질감염 세포주의 방사선 처리후 생존률을 나타낸 그래프도. B: Prx II- 과발현 세포주에서 Prx II의 발현 여부를 나타내는 웨스턴 블롯 결과도. 레인 1, MCF- 7/neo; 레인 2, MCF- 7/Prx II/1; 레인 3, MCF- 7/Prx II/2; 레인 4, MCF- 7/Prx II/3.

도 4는 Prx II 안티센스 올리고머- 처리된 11A 세포에서 세포 생존율을 나타내는 그래프도. A: 방사선 조사 없이 AS 1, AS2 및 S1로 3회 형질감염시킨 11A 세포 생존률을 나타내는 그래프도. B: 방사선 조사전에 두가지 상이한 농도의 AS1, 0.1 또는 1.0 μ M로 형질감염시킨 후 3Gy 방사선을 조사한 11A 세포. A 및 B에서 레인 C는 pcDNA3 1 μ g으로 형질감염된 세포임. C: Prx II 안티센스 올리고머(AS1)- 형질감염 11A 세포에서 Prx II의 발현의 억제를 나타내는 웨스턴 블롯 결과도. 레인 C: 안티센스를 함유하지 않는 DNA로 형질전환된 세포; AS1, AS1로 형질전환된 세포; AS 2, AS2로 형질전환된 세포; S1, S1로 형질전환된 세포; R 1h, 1시간 조사후 수확한 세포; R 24h, 24시간 조사후 수확한 세포.

도 5는 안티센스 Prx II 전 염기서열을 포함하는 플라스미드(pPrxII/AS)를 두경부암(A) 및 유방암(B) 세포에 주입시킨 후 방사선을 조사하여 암세포의 살상효과를 측정한 그래프도.

도 6은 Prx II 안티센스 올리고머(AS1)으로 형질감염시키거나 시키지 않은 11A 세포로부터의 DNA의 아가로스 겔 전 기영동결과도(M.W., λ HindIII 마커; C, 대조군; R Gy 조사; AS1, Prx II 안티센스 올리고머).

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 항산화 효소 기능을 갖는 인간 페록시레독신 II(peroxiredoxin II; 이하, Prx II라고 부름) 유전자 안티센스 염기서열을 포함한 방사선 증감제 및 이것의 방사선 치료에 있어서의 용도에 관한 것이다. 더욱 구체적으로 본 발명은 Prx II의 안티센스를 두경부암, 유방암 등의 암세포에 처리하여 방사선 조사후 Prx II의 발현을 차단함으로써 이들 암에 대하여 방사선 조사에 대한 내성을 제거하는 방법 및 이 방법에 사용되는 Prx II의 안티센스를 포함하는 서열 및 이들의 용도에 관한 것이다.

외과적 수술과 함께 방사선 요법 및 화학 요법은 두경부암 및 유방암의 치료에 흔히 사용된다. 그러나, 상당수의 암은 방사선 요법 및(또는) 화학 요법에 반응하지 않는 수도 있는데, 많은 형태의 암은 지속적인 방사선 및 항암제 치료후에 덜 감수성이거나 내성이 생기기 때문이다. 화학요법제/방사선 요법 내성의 분자적 메카니즘에 관한 연구가 광범위하게 진행되고는 있으나, 이러한 내성을 극복하는 것은 여전히 해결되지 않고 있다.

인간 페록시레독신 II는 세포내 과산화수소를 환원시키는 항산화 단백질로 기능하는 것으로 알려져 있다.

포유류 Prx 집단(family)은 아미노산 서열을 기초로 두 그룹으로 나뉜다: 두 보존된 시스테인 그룹 I, II, III 및 IV, 및 한 보존된 시스테인 그룹 V 및 VI [참고문헌: Kang, S. W., et al., J. Biol. Chem., 273: 6303- 6311, 1998; Lim, Y.S., et al., Gene, 140:279- 284, 1994; 및 Kim, K., et al., J. Biol. Chem. 263:4704- 4711, 1988]. 페록시레독신(Prx)은 이전에는 티오레독신 페록시다아제(TPx, thioredoxin peroxidase)로 알려졌으며, 이는 티오레독신에 의해 제공되는 전자들을 사용하여 H_2O_2 를 환원시킨다(참고문헌: Chae, H. Z., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91:7017- 7021, 1994; 및 Chae, H. Z., et al., J. Biol. Chem., 269:27670- 27678, 1994]. 그러나 아직까지는 다양한 종에서 발견되는 Prx 집단의 모든 원들이 페록시다아제로서 실제로 작용하는지에 대하여는 명확히 확립되지 않았다[참고문헌: Chae, H.Z. et al., J. Biol. Chem., 268:16815- 16821, 1993]. 일부 Prx 집단들은 전자 공여자로서 티오레독신을 필요로 하지 않기 때문에, 이들은 TPx라고 하지는 않는다. 포유류 조직들은 Prx 아이소형(isoform)을 발현하며 그의 과발현은 세포내 과산화수소의 축적을 방지하여 세포치사를 억제하는 결과를 초래하였다[참고문헌: Kang, S. W., et al., J. Biol. Chem., 273:6297- 6302, 1998; 및 Zhang, P., et al., J. Biol. Chem., 272:30615- 30618, 1997]. Prx II는 또한 천연 킬러- 중대 인자 B (NKEF- B)이었다. 48 kDA의 분자량을 가지는 NKEF는 이항화 결합에 의해 연결된 두 개의 소단위로 구성되어 있다[참고문헌: Shau, H., et al., Cell. Immunol., 147:1- 11, 1993]. 이것은 처음에는 인간 적혈구에서 발견되었으며, 천연 킬러 세포의 세포독성을 증대시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 이는 두 개의 섹그룹, NKEF- A 및 NKEF- B로 분류되었고 각각 후에 Prx I 및 Prx II로 동정되었는데, 이들의 일차 서열은 서로에 대해 고도로 상동성을 가진다[Shau, H., et al., Immunogenetics, 40:129- 134, 1994]. Prx I의 cDNA 서열은 인간 증식- 관련 유전자(PAG, proliferation- associated gene)에 대해 상동성이며 세포 증식 및 분화에 관련된 것으로 알려져 있다[참고문헌: Prosperi, M. T., et al., J. Biol. Chem., 268:11050- 11056, 1993]. 반면, Prx II의 cDNA 서열은 티올- 특이성 항산화제 단백질에 대해 상동성을 나타내는데, 이는 단백질 티올 라디칼의 형성을 억압한다. 따라서, Prx II는 항산화 단백질로서 기능하며, 이는 반응성 산소종(ROS, reactive oxygen species) 또는 세포의 산화적 손상으로부터 세포를 보호하는 것으로 제안되었다[참고문헌: Shau, H., et al., Free Rad. Biol. Med., 22:497- 507, 1997].

문헌 [Kim, A. T., et al., Toxicol. Appl. Pharmacol., 147:135- 142, 1997]은 Prx II mRNA의 유발은 과산화수소로 처리된 인간 상피세포(ECV304)에서 증가되는 것으로 보고하였다. 더욱이, t- 부틸퍼옥사이드 또는 메틸 수은에 노출된 ECV 304 세포에서 Prx II의 과발현은 ROS 발생을 감소시켰으며 이는 산화적 스트레스로부터 증가된 보호를 초래하였다[참고문헌: Sarafian, T. A., et al., Free Rad. Res., 26: 281- 289, 1997]. 그러나, Prx II의 과발현은 세포내 글루타치온(GSH)의 고갈에 의한 산화적 손상으로부터 세포를 보호하지 못했다. 따라서, Prx II의 활성은 GSH에 의해서가 아니라, 티오레독신 시스템에 의한 단백질 티올- 티올 교환에 의해 조절되는 것으로 제안되었다.

HeLa 세포에서 기저 섬유아세포 성장 인자(bFGF)에 의해 유발된 G2 지연은 방사선 조사 내성에 관련된 것으로 제안되었으며(참고 문헌: Cohen- Jonathan, E. et al., Cancer Res. 57 (1997) pp1364- 1370), 부르키트(Burkitt's) 임파종 세포에서 세라미드 시그널링(ceramide signaling)이 방사선- 내성 메카니즘에 수반되는 것으로 보인다[참고문헌: Michael, J. M., et al., Cancer Res., 57:3600- 3605, 1997]. 암세포에서 화학요법제 및 방사선 치료 내성에 대한 메카니즘은 잘 알려져 있지 않다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명자들은 화학요법제 및(또는) 방사선 조사요법을 이용하여 암을 치료하는 과정에서 방사선 조사에 의해 암세포, 특히 방사선 치료에 대하여 내성을 갖는 유방암 또는 두경부암 세포에서 Prx II의 발현이 증가되고, 이 증가된 Prx II 단백질에 의해 방사선에 의한 암세포 살상률이 감소되는 문제점을 해결하기 위해 예의 연구한 결과, Prx II의 안티센스 서열을 함유한 형질전환체를 암세포에 처리할 경우 방사선 조사후 Prx II의 합성이 억제되고, 따라서 이것이 암세포의 방사선 감수성을 증대시킴으로써 방사선 증감제로서 이용될 수 있음을 발견하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

따라서, 본 발명의 목적은 인간 폐록시레독신 II 안티센스 서열 또는 이것의 일부를 포함하는 올리고머 서열을 포함하는 방사선 증감제를 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

γ - 선 조사 및 화학요법 약물 등의 DNA 손상 제제들이 수많은 암의 치료에 흔히 이용되어 왔으나, 세포는 계속적인 화학요법제의 투여 및 방사선 조사에 대해 급격히 내성을 갖게 된다. 따라서, 이들 화학요법제 및 방사선 조사 내성을 극복하거나 또는 화학요법제 및 방사선 요법에 대한 세포의 감수성을 증가시키려는 연구는 더 나은 암 치료에 대한 임상적 단계를 제공한다.

본 발명자들은 두 상이한 암세포주를 사용하여 Prx II의 발현이 시험관내 및 생체내 방사선 요법에 대한 세포의 내성과 관련이 있는지 및 Prx II 안티센스가 방사선증감제로서 작용하는지에 대하여 시험을 수행한 결과, Prx II의 증가된 발현은 방사선 요법에 반응하지 않았던(방사선 치료 내성) 환자들로부터 단리된 조직에서 관찰된 반면, Prx II 발현은 퇴행성 종양(방사선 요법 감수성)을 가진 환자들로부터의 조직에서는 미약함을 확인하였다. UMSCC- 11A 세포 및 MCF- 7 세포에서 Prx II의 증가된 발현은 또한 γ - 선 조사에 의해 처리한 후에도 또한 관찰되었다. 이 증가된 발현은 암세포에 방사선 내성을 부여하며, 이는 Prx II의 과발현으로 인하여 MCF- 7 세포가 방사선에 의한 암세포의 치사를 방지하였기 때문인데, 즉 Prx II 발현을 차단함으로써 방사선 감수성을 증가시키는 것이 가능함을 의미한다. UMSCC- 11A 세포 및 MCF- 7 세포 모두를 Prx II 안티센스로 처리했을 경우에는 Prx II의 유발이 감소되었으며, 방사선 감도가 증가되는 결과가 초래되었다. 이러한 결과들로부터, Prx II의 스트레스에 의해 유발되는 과발현은 암세포가 방사선에 의한 암세포의 치사로부터의 보호를 통하여 방사선 내성을 수반하며, 이 경우 Prx II 안티센스는 방사선증감제로서 이용하여 방사선 내성을 방사선 감수성을 변화시키는 것이 가능하다.

이하, 본 발명을 구체적인 방법론에 관련하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 이들 방법론들은 본 명세서에서 인용한 문헌에 교시된 방법 또는 이들 문헌에 기재된 방법을 변형하여 수행하는 것도 가능하므로, 본 발명은 첨부된 특허청구범위에 의해서만 한정되어야 한다.

본 발명자들은 스트레스- 활성화된 유전자 유발의 억제가 화학요법제 및(또는) 방사선 내성을 극복하는 유력한 열쇠를 제공할 것이라는 기대하에 방사선 치료에 대한 세포의 내성에 있어서 Prx II의 가능한 역할에 대해 검사하고 두경부암 및 유방암 세포에서 가능한 방사선 증감제로서 Prx II 안티센스를 조사하였다. 반응성 산소종(ROS)- 활성화 단백질의 유도는 세포가 산화적 세포용해되는 것을 방지하며 세포의 레독스 상태를 조절을 통하여 세포의 손상을 감소시킨다(Sun, Y., Free Rad. Biol. Med., 8:583- 599, 1990; Hampton, M.B. et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 854:328- 355, 1998; Rainwater, R., et al., Mol. Cell. Biol., 15:3892- 1903, 1995; 및 Sato, N., J. Immunol., 154:3194- 3203, 1995]. 베이커 등[참고문헌: Baker, A., et al., Cancer Res., 57:5162- 5167, 1997]은 레독스 단백질 티오레독신이 인간의 시원(primary) 폐 및 대장 암에서 과발현되었고, 항산화 메카니즘을 통해 세포사멸을 방지하였음을 관찰하였다. 본 발명자들은 화학요법제/방사선 치료 내성의 환자에서 단리한 종양 조직에서 Prx II의 강한 발현을 관찰한 반면, Prx II의 과발현은 방사선치료후에 퇴화된 화학요법제/방사선- 감수성 종양 조직에서는 약함을 관찰한 바 있다(도 1). 방사선 조사된 11A 세포에서 Prx II의 증가된 발현과 마찬가지로, 11A 세포에서 Prx II의 발현은 마찬가지로 시스플라틴 (5 $\mu\text{g}/\text{Ml}$) 및 5- FU(5- 플루오로우라실) (2.5 $\mu\text{g}/\text{Ml}$) 등의 화학요법제에 의해서도 증가되었다. 따라서, 시스플라틴, 5- FU 및 방사선에 의해 유발된 세포내 ROS는 암세포에서 Prx II의 발현을 증가시키고 이에 의해 암세포에 내성을 부여하는 것으로 보인다. Prx II의 과발현은 ECV304 세포에서 화학요법제 CT- 2584에 더 많은 내성을 가짐에

유의하여야 하며, 본 발명자들은 또한 모세포에 비하여 시스플라틴 내성 위 세포에서 Prx II의 강한 발현을 관찰하였다 (데이터로 나타내지 않음). 상기 사항들을 고려할 때, Prx가 항산화 단백질로서 작용할 뿐만 아니라 스트레스- 활성화 단백질로서도 작용하는 것으로 보인다.

Prx II 단백질은 티오레독신 등의 티올- 함유 단백질과 반응하는 티올- 특이성 항산화제로서 기능하는 것으로 제안되었다[참고문헌: Shau, H., et al., Biochem. biophys. Res. Commun., 249:683- 686, 1998]. 세포의 티올- 특이성 단백질들은 조절 도메인에서 트롤류와의 다른 세포성 단백질의 작용, Prx II의 억제 작용을 조절하는 것으로 보이며, 따라서 세포 성장 및 생존을 위한 시그널링 경로에 영향을 미치는 것으로 보인다. 세포내 레독스 상태의 파괴는 카스페이즈 3 캐스케이드를 활성화시켜 세포사멸을 초래하는 것으로 보인다. 장(Zhang et al) 등은 Prx II의 과발현이 Molt- 4 백혈병 세포에서 세포사멸을 억제하였으며 Bcl- 2와 유사하게 작용함으로 밝힌 바 있다(참고문헌: Zhang et al., 상기 함): Prx II 및 Bcl- 2 사이의 기능상 차이점은 Prx II는 세포에서 과산화수소의 축적을 방지하고 이에 의해 세포가 과산화수소 유발- 세포 치사하는 것을 방지한다는 점이다. 이러한 관찰로부터 Prx II 안티센스를 사용한 11A 세포의 처리에 의해 DNA 래더, 세포사멸 그 자체의 지시자(indicator)의 형성이 유발된 반면, DNA 래더의 형성은 3 Gy 조사된 세포에서는 관찰되지 않음을 설명할 수 있다(도 6).

Prx II 발현의 억제는 Prx II 안티센스 처리된 조사된 11A 세포에서 GSH, 세포의 레독스 상태의 지시자의 세포내 농도에 영향을 미치지 않았다. 이 관찰은 Prx II의 활성이 GSH의 세포내 농도에 의해 조절되지 않았다는 이전의 결과와 일치한다(참고문헌: Kim, et al., 상기함). 따라서, Prx II의 발현의 차단은 GSH 농도가 아닌 세포내의 레독스 항상성을 파괴할 수도 있으며, 이는 세포사멸을 초래할 수도 있다[참고문헌: Sato, et al., 상기함]. 방사선 조사 내성을 극복하기 위한 연구는 더 양호한 암 치료에 대해 중요하기 때문에 스트레스- 활성화된 단백질 Prx II의 불활성화는 두경부암 세포에서 증가된 방사선 조사 감수성에 대한 유망한 접근법일 수 있다. 본 발명에서 사용된 바의 유전자 클로닝 방법은 기술 분야에서 공지된 방법론을 채용하여 용이하게 수행할 수 있다. 이러한 방법론은, 예를 들면 문헌들 [Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.; 및 Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associate and Wiley Interscience, N.Y.]을 참고할 수 있다.

안티센스 Prx II 유전자로서는 공지된 그의 전장(서열표 6)의 유전자가 사용되어도 좋으나, 이 서열의 일부를 포함하는 올리고머 형태, 예컨대 서열표 3 및 4에 나타난 올리고머의 형태도 바람직하게 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명에 바람직하게 사용될 수 있는 안티센스로서 서열로서는 본 발명의 명세서에 기재된 바의 서열에 국한되지 않고, 방사선 치료 내성의 환자에 있어서, Prx II의 발현을 억제함으로써 방사선 요법 감수성을 부여할 수 있는 것이라면 임의의 것(예컨대, 동일한 기능을 수행할 수 있는 기능성 유사체 또는 변이체, 그의 부분 서열, 올리고머 형태를 모두 포함함)을 사용할 수 있다.

이하, 본 발명은 다음의 본 발명의 대표적인 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명되나, 본 발명이 이들 실시예에 의해 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

< 실시예>

실시예 1: 세포 배양

인간 유방암 세포주(MCF- 7)는 ATCC로부터 구매하였으며 10% 태아송아지 혈청, 페니실린 100 units/ml, 및 스트렙토마이신 100µg/ml을 함유하는 IMDMB 배양 배지(GIBCO/BRL, Grand Island, NY)에서 배양시켰다. 두경부암 세

포(UMSCC- 11A)는 ATCC로부터 구매하였다. UMSCC- 11A(이하, " 11A" 세포라 함)를 10% 태아송아지 혈청, 페니실린 100 units/ml, 및 스트렙토마이신 100µg/ml을 함유하는 DMEM/F12 배양 배지(GIBCO/BRL, Grand Island, NY)에서 배양시켰다.

실시예 2: 조직 시료의 제조 및 노던 블롯 분석

종양 조직들은 외과적 절제술을 받은 두경부암 환자 10명으로부터 분리하여, 빙냉 염수 용액으로 세정하고, 액체 질소 중에 신속히 동결시켜 RNA 단리에 필요할 때까지 - 70°C에서 보관하였다. 동결된 조직들을 액체 질소로 잘게 썰고 RNA를 TRIzol 시약(GIBCO/BRL, Grand Island, NY)으로 페놀/클로로포름법을 사용하여 제조원의 지시에 따라 단리하였다. 레인 당 전체 RNA 10 µg을 1% 아가로스/포름알데히드 겔 상에 분획화시키고, 나일론막(NEN, Boston, MA)으로 옮겼다. 블롯을 인간 Prx II의³² P- 표지된Clal- XbaI 단편으로 프로브처리하였다. 혼성화는 종래에 기술된 방법으로 수행하였다[참고문헌: Chomczynski, P., et al., Anal. Biochem. 162:156- 159, 1987].

실시예 3: 면역블롯팅

상기 실시예 2에서 처리된 세포들을 수확하여 인산염 억제제(1 mM 소듐 오르도 바나데이트, NaF 30mM, 페닐 메틸 술폰일 폴루오리드 1mM, NaPPi 30 mM)을 포함하는 RIPA 완충액 (NaCl 150 mM, 1% Nonidet P- 40, 0.5% 데옥시콜린산, 0.1% SDS, Tris 50 mM, pH 8.0)으로 가용화시켰다.단백질 농도를 바이로라드 단백질 에세이 키트(BioRad, Hercules, CA)에 의해 결정하였다. SDS- 폴리아크릴아미드 겔 상에서 분리한 후에, 단백질을 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 옮기고 Prx II 단백질을 anti- Prx II 폴리클로날 항체를 사용하여 검출하였다[참고문헌: Kang, S. W., et al., 상기함].

실시예 4: 센스 및 안티센스 Prx II 발현 벡터 및 안정된 세포주의 제작

먼저 Prx II의 안티센스 염기서열을 PCR(polymerase chain reaction)에 의하여 제작하였다. 즉, 바이오니아사에서 제작한 Prx II 센스 프라이머인 TAGCCTTTGCCACGCGAGCT (서열표 1)와 안티센스 프라이머인 TCCGTTAGCCAGCCTAATTG (서열표 2)에 물 61.5 µl, 버퍼 10 µl, dNTPs 각각 2 µl, Taq 폴리머라아제 0.5 µl를 첨가한 후 94 °C에서 10 분 동안 인큐베이션시킨 후, 94 °C, 1 분 - 72 °C, 1분 - 55 °C 1 분의 주기의 인큐베이션을 30회 반복함으로써 서열표 6에 기재된 서열을 제작하였다. 이와 같이 합성된 Prx II 안티센스 유전자 단편을 pcDNA3 (The Netherlands, InVitrogen사로부터 구매) 내에 삽입하기 위하여 pPrxII/S 및 pPrxII/AS를 제작하였다. pPrxII/AS는PrxII 유전자의 도립NdeI- BamHI 단편을 함유하였다. Prx II- 과발현 세포주를 전에 기술된 바와 같이(참조문헌 19), MCF- 7 세포에 작제하였다. 3개의 콜로니들을 단리하고 배양하여 콜로니형성(clonogenic) 에세이 및 웨스턴 블롯팅에 사용하였다.

실시예 5: 콜로니형성(clonogenic) 에세이

지수기의 세포들을 계수하고, 희석하여 페트리 디쉬 당 300 세포로 3회 중배양시켰다(100 mm 디쉬). 세포들을 37°C의 함수 CO₂ 인큐베이터에서 24 시간 동안 인큐베이션시키고,¹³⁷ Cs γ - 선 소스(Atomic Energy of Canada, Ltd, Canada)로 γ - 선으로 3.81 Gy/min의 투여율로 조사하였다. 콜로니들을 10일 동안 성장시키고, 1% 메틸렌 블루로 염색하였다. 직경이 200µm 이상인 콜로니들을 콜로니계수기(Imaging Products, Chantilly, VA)로 계수하였다.

실시예 6: 세포의 방사선 조사 감작화

지수기의 세포(2×10^5)를 35 mm 배양 접시로 옮기고 이 세포들을 24 시간 동안 배양하였다. 무혈청 배지로 2회 세척한 후, 세포들을 무혈청 배지 1 ml 중의 양이온성 리포좀(BodyTech, Chuncheon, Korea) 15 μ g과 안티센스 Prx II 발현벡터 pPrxII 또는 안티센스/센스 올리고머(AS1, 5'- CGCGCGTTACCGGAGGCCAT- 3'(서열표 3); AS2, ACGCCGTAATCCTCAGACAA(서열표 4); S1, ATGGCCTCCGGTAACGCGCG(서열표 5))의 다양한 투여량의 혼합물로 4- 6 시간 동안 인큐베이션시켰다. 세포들을 무혈청 배지로 세척하고 이어서 배양 배지에 첨가한 후 16 시간 동안 배양하였다. 형질감염은 2회 더 반복하였다. 형질감염 16 시간 후, 세포들을 γ - 선에 137 Cs γ - 선 소스로 조사하였다. 37°C에서 5일의 인큐베이션 후, 세포들을 0.4% 트리판 블루로 염색하고 계수하였다.

실시예 7: DNA 분획화 분석

11A 세포들이 ~ 80% 융합(confluent)에 이를 때까지 성장되었을 때, 세포들을 트립신 처리하여 세포 밀도 10,000 세포/ cm^2 에서 조직 배양 플라스크 상에 리플레이팅시켰다. 세포들을 1 μ M 농도의 상기한 Prx II 안티센스(AS1)의 올리고머 서열(서열표 3)로 형질감염시켰다. 방사선 조사후 배양 배지를 새로운 배지로 교환하였다. 48 시간 동안 배양한 후, 세포들을 수확하여 10,000g로 15 분 동안 원심분리시켰다. PBS로 1회 세척한 후, 펠릿들을 프로테이나아제 K (10 mg/ml)을 함유하는 용해 완충액(10 μ M Tris- HCl, pH 8.0, 75 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% SDS) 중에 현탁시킨 다음, 현탁액을 3 시간 동안 50°C에서 가볍게 진탕시키면서 인큐베이션시켰다. 이어서 DNA를 페놀/클로로포름/이소아밀 알코올(25:24:1)을 사용하여 세포 용해물로부터 분리하여 이소프로판올로 침전시켰다. 이 펠릿을 75% 에탄올로 세척한 후, 이것을 150 μ g/ml RNase를 포함하는 TE 완충액(10 mM Tris, pH 7.5, 0.1 mM EDTA) 중에 용해시켜 50°C에서 3 시간 동안 인큐베이션시켰다. 이 DNA 시료를 1.5% 아가로스 겔 상에 전기영동에 의해 DNA 분획화에 대하여 분석하였다.

실시예 8: 방사선 조사후 두경부암 모델에 있어서 Prx II의 증가된 발현

Prx II는 산화적 스트레스하에 유발되고 그의 과발현은 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 것으로 나타났기 때문에, 본 발명자들은 먼저 Prx II 발현이 두경부암 조직에서 화학요법제/방사선 조사 내성에 관련되어 있는지를 조사하였다. Prx II의 발현을 확인하고, 화학요법제/방사선 조사 내성에서 Prx II의 역할을 연구하기 위하여, 본 발명자들은 화학요법제/방사선 조사 요법- 감수성의 군 및 화학요법제/방사선 조사- 내성의 군의 환자의 두 집단의 환자로부터 종양 조직을 얻었다. 두경부암환자에 대하여 방사요법에 앞서 시스플라틴 및 5- FU 등의 화학요법제 치료를 행하였다. 따라서 환자들은 만니톨을 함유하는 완충 염수와 함께 시스플라틴 100 mg/m^2 으로 처리한 후, 이어서 5- FU (1000 mg/m^2)에 이어, 화학요법 후 생존한 종양을 γ - 선 조사를 하였다. 환자의 프로파일은 표 1에 나타났다. 암요법의 효율은 치료후 잔여 암조직의 조건에 의해 결정하였다.

[표 1]

화학요법제/방사선 조사 요법으로 처리한 환자의 프로파일

사례	연령	부위	화학요법의 회수	방사선조사(cGy)	반응
1	77	후두	ND ^a	7020	CR ^b
2	70	하인두	3	7020	CR
3	51	후두	ND	6600	CR
4	64	상악골	1	7000	PR ^c
5	61	하인두	3	7000	CR
6	25	중이	3	7000	NR ^d
7	55	비강	1	5440	NR
8	63	구치후삼각	3	5800	NR
9	51	이하선	3	7020	NR

주: a= 수행하지 않음; b= 완전한 반응; c= 부분 반응; d: 미반응.

두경부암 환자에서 Prx II의 발현은 후술하는 노던 블랏 분석법을 사용하여 탐지하였다. 전체 RNA (각 10 µg)을 방사선 표지된 인간 Prx II cDNA 프로브에 혼성화시켰다. 동일한 부하는 에티뮴 브로마이드 염색으로 입증하였다. 도 1에서 보는 바와 같이, 화학요법제/방사선 조사 처리한 경우(방사선 조사 내성)의 모든 4 경우로부터 종양 조직에 있어서 Prx II mRNA의 강력한 발현이 나타난 반면, 방사선 조사 또는 화학요법제/방사선 조사 처리후에 종양이 완전히 또는 부분적으로 퇴화한 환자(방사선 조사 감수성)의 5 가지 사례 모두는 그 효과가 약하거나 또는 유도되지 않았다. 이러한 결과는 두경부암에서 Prx II의 세포를 방사선 조사 처리로부터 보호할 수도 있으며, 따라서 암에서 방사선 조사 처리하여 세포에 내성을 부여하는 것을 의미한다.

실시에 10: 방사선 조사후 Prx II의 증가된 발현

Prx II의 발현이 방사선 조사후 증가되었는지를 시험하기 위하여, 두가지 상이한 형태의 고형암 세포주, 11A 및 MCF-7를 3 Gy 또는 10 Gy로 방사선 양으로 조사하였다. 도 2는 방사선 조사후 Prx II 단백질의 유도과정을 나타낸다. 11A 및 MCF-7 세포들을 방사선 조사하고, 정해진 시간대에 따라 수확하여, Prx II의 경시적 발현을 Prx II 폴리클로날 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 탐지하였다. 11A 세포(A)는 3 Gy로 조사하고, MCF-7 세포는 표지된 투여량으로 조사하였다. 동일한 단백질량의 부하는 폰시(poncea) S 염색에 의해 확인하였다. 11A 세포에서 Prx II의 발현은 3Gy 조사후 24 시간까지는 점차로 증가하였다(도 2A). 3 Gy조사에 의해 Prx II의 발현이 24 시간 동안은 변화되지 않았으나, 10 Gy의 조사량에 MCF-7 세포를 노출시켰을 경우 6 내지 24 시간 동안에 Prx II의 발현이 점차 증대된 결과가 초래되었다(도 2B). MCF 7 세포에서 Prx II의 기저 수준은 11A 세포에서 보다 더욱 강한 것으로 나타났다.

실시에 11: Prx II의 방사선보호 효과

Prx II의 과발현은 t- 부틸퍼옥사이드 또는 메틸 수은의 처리와 함께 산화적 스트레스로부터 ECV304 세포를 보호하는 것으로 나타났기 때문에, 본 발명자들은 MCF-7 세포를 pcDNA3 벡터 또는 Prx II cDNA의 개방 해독 프레임을 가진 CMV 프로모터를 함유한 벡터로 형질감염시켜 Prx II의 증대된 발현이 세포를 방사선 조사로부터 보호했는지를 검사하였다. 도 3에 Prx II- 과발현 MCF-7 세포에서 방사선조사 후 세포 생존율을 그래프로 나타내었다. A는 방사선 처리된 안정된 세포주의 클로니형성(clonogenic) 생존율을 나타낸다. 세포들은 1, 2 및 4 Gy로 조사되었으며, 세포 생존은 후술하는 클로니형성 에세이를 사용하여 결정하였다. B는 Prx II- 과발현 세포주에서 Prx II의 발현을 나타내는 것으로서, 단백질 용해물들은 SDA- PAGE에 의해 분석하였고, Prx II 발현은 웨스턴 블로팅에 의해 분석하였다. 클로닝된 형질감염체, Prx II/S1, Prx II/S2, 및 Prx II/S3에서 Prx II의 증대된 발현은 1 및 2 Gy의 방사선량의 투여후 약 50 % 정도의 세포 생존율을 증대시켰다(도 3A). Prx II/S1, Prx II/S2, 및 Prx II/S3 클론에서 Prx II의 발현 프로파일은 웨스턴 블롯 분석에 의해 탐지하였다(도 3B). 이들 결과로부터, 유발된 Prx II 단백질은 방사선- 조사된 세포의 손상을 방지하는 것으로 보인다.

실시예 12: 방사선 증감제로서 Prx II 안티센스

Prx II 안티센스를 11A 세포에 처리한 결과는 대조군 세포 및 조사된 세포 모두에서 Prx II의 유발을 방지하였으므로, Prx II의 안티센스 올리고머들(서열표 3 및 4)을 상기한 방법에 따라 11A 세포내로 형질감염시키고, Prx II의 다운 조절(down- regulation)이 세포를 시험관내 조사에 대해 감작화시켰는지를 검사하였다. 도 4에 Prx II 안티센스 올리고머- 처리된 11A 세포에서 세포 생존율을 그래프로 나타내었다. 11A 세포들은 AS1, AS2 및 S1로 방사선 조사 없이 3회 형질감염시켰다(A). 7일 후, 11A 세포들을 수확하고, 세포 생존율을 트리판 블루 염색후 세포 계수에 의해 평가하였다. 또한, 11A 세포들을 방사선 조사전에 두가지 상이한 농도의 AS1, 0.1 또는 1.0 μ M로 형질감염시켰다. 3Gy 방사선 조사하였다. Prx II 안티센스 올리고머(AS1, 서열표 3)- 형질감염 11A 세포에서 Prx II의 발현의 억제 결과는 4C에 나타내었다. Prx II의 발현은 조사를 하거나 조사를 하지 않고 웨스턴 블롯팅에 의해 탐지하였다. 도 4A에서 알 수 있는 바와 같이, 보다 많은 투여량의 Prx II 안티센스(AS1)이 11A 세포에서 증가되었고 더많은 세포의 치사가 관찰되었다. Prx II cDNA의 다른 개방 해독 프레임을 표적화한(targetting) 두 번째 안티센스(AS2)는 AS1 처리와 유사한 결과를 나타내었다(도 4A). 11A 세포를 Prx II 센스 올리고머(S1, 서열표 5)으로 처리한 결과 대조군 세포에 비하여 세포 생존능이 변화되지 않았다. 이러한 결과는 Prx II 안티센스가 세포 치사를 일으켰으며 이는 사용된 Prx II 안티센스의 농도에 의존함으로 의미한다.

도 4B의 결과에 의하면, 3Gy의 방사선 조사후 11A 세포의 ~ 64%가 생존하였으며, Prx II 안티센스(AS1) 0.1 μ M 만을 처리한 후에는 ~ 72%가 생존하였으나, 세포 생존율은 Prx II 안티센스 0.1 μ M의 존재하에 3Gy 방사선 조사후 ~ 32%까지 더 감소하였고, Prx II 안티센스(AS1) 1.0 μ M로는 ~ 19%까지 감소하였다(도 4B). Prx II 안티센스 1.0 μ M 그 자체는 11A 세포에서 ~ 54%의 세포 치사를 유발하였다.

이어서, Prx II의 다운 조절(down- regulation)이 방사선 조사후 세포치사를 증대시켰는지를 확인하기 위하여, 11A 세포 및 MCF- 7 세포 모두를 3개의 상이한 농도의 전체 길이 안티센스 Prx II cDNA를 함유하는 안티센스 Prx II 발현 벡터(pPrx II/AS)로 일시적으로 형질감염시켰다. 그 결과를 도 5에 나타냈다. 11A 및 MCF- 7 세포들을 pPrx II /AS 0, 0.1, 0.5, 및 2.0 μ g/ml로 형질감염 시켰다. 이어서 세포들을 1, 3 및 5 Gy로 조사하였다. 세포 생존율은 트리판 블루 염색 후 세포 계수에 의해 평가하였다. 방사선을 조사하지 않았을 경우에 플라스미드 농도에 따라 암세포의 살상율이 증가하였고 2.0 μ g/ml의 농도에서 50% 살상 효과를 보였다. 방사선을 조사하였을 경우, 1 Gy와 3 Gy의 방사선의 조사시, Prx II 안티센스가 방사선 치료 증진 효과를 보여주었다. 방사선 조사 없이 0.1 μ g/ml의 Prx II 안티센스 플라스미드(pPrxII/AS)를 처리하였을 경우 14%의 암세포 살상효과가 있었고, 3Gy의 감마선만을 조사하였을 경우 pCDNA3에서는 29%의 암세포 살상 효과를 초래하였지만, 11A 세포를 3Gy γ - 선 조사하면서 pPrx II/AS 0.1 μ g/ml로 형질감염시켰을 때, 이는 ~ 67%의 암세포 치사를 유발하였다(도 5A). Prx II 안티센스로 형질감염된 세포들은 pcDNA3로 형질감염된 모세포(대조군)에 비하여 방사선 조사후 세포 치사의 상승적 증가를 나타내었다. 이 방사선 조사에 대한 상승적 감수성은 MCF- 7 세포(도 5B)에 비하여 11A 세포에서 더욱 현저하였다(도 5A). 이러한 데이터로부터 Prx II의 발현이 세포가 방사선 조사- 유발 세포 치사를 방어하며 따라서 방사선 감수성은 안티센스 Prx II를 사용한 Prx II 발현의 억제에 의해 증대시킬 수 있음을 의미한다. 도 5의 결과에 의하면, Prx II/AS로 형질감염시키고, 5Gy의 방사선을 조사할 경우에도 민감한 효과가 초래되어 방사선 치료 효과를 높이는 것이 가능하며 감수성의 정도는 3 Gy에서 더 높다.

실시예 13: Prx II 안티센스의 세포사멸 효과

Prx II 안티센스의 존재가 세포사멸을 자극하고 방사선 조사후 세포 손상을 증대시키는지를 입증하기 위하여, DNA 래더(ladder)의 형성을 Prx II 안티센스로 11A 세포를 처리한 후에 검사하였다. 그 결과를 도 6에 나타냈다. DNA는 AS1의 존재 또는 부재하에서 방사선 조사후 48 시간 동안 배양된 11A 세포로부터 분리하여 아가로스 겔 전기영동에 의

해 분석하였다. DNA 래더들은 에티뮴 브로마이드로 겔을 염색함으로써 가시화시켰다. 도 6의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, Prx II 안티센스 단독이 세포사멸을 유발할 수 있음을 나타낸다. 또한, DNA 래더의 증가된 생산은 세포내 세포사멸을 지적하는 DNA 래더의 형성은 3Gy 방사선조사후 48시간에 수확한 11A 세포에서는 관찰되지는 않았으나 Prx II 안티센스로 전처리한 방사선 조사한 11A 세포에서 관찰되었다.

발명의 효과

기존의 방사선 요법에 대하여 내성을 갖는 암 세포에 대하여, 본 발명에 따라 Prx II 안티센스 플라스미드를 처리한 후, 방사선을 조사하였을 경우, 67% 이상의 두경부암, 유방암 등의 암세포 살상 효과가 나타났으므로, 본 발명에 따른 안티센스 Prx II 서열은 방사선 치료에 내성인 두경부암 또는 유방암의 환자에 있어서 방사선 조사 감수성을 부여하는 방사선 증감제로서 바람직하게 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

인간 페록시레독신 II(peroxiredoxin II) 안티센스 서열 또는 이것의 부분 서열을 포함하는 방사선 증감제.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 페록시레독신 II 안티센스 서열이 서열표 6에 나타낸 서열이거나 이것과 동일한 기능을 하는 그의 변이체인 방사선 증감제.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 부분 서열이 서열표 3 및 4에 나타낸 올리고뉴클레오티드인 방사선 증감제.

청구항 4.

제1항에 따른 방사선 증감제를 암세포의 방사선 조사 요법과 병행하여 사용하는 것을 특징으로 하는 두경부암 또는 유방암의 방사선 치료 내성을 감소시키는 방법.

청구항 5.

제4항에 있어서, 상기 암이 두경부암 또는 유방암인 방법.

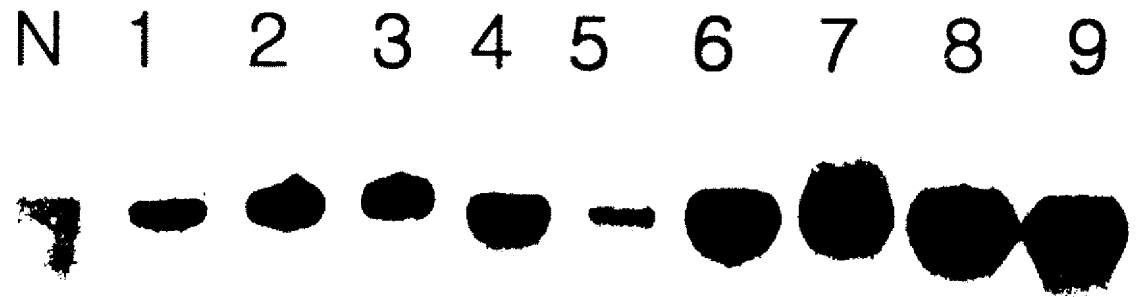
청구항 6.

제4항에 있어서, 사용된 방사선이 1 내지 5 Gy의 감마선인 방법.

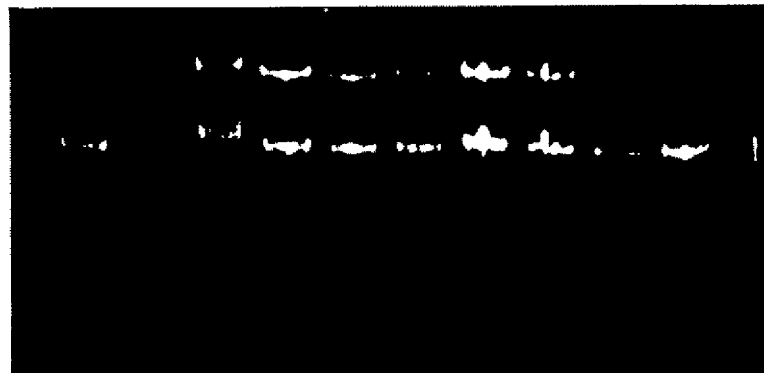
도면

도면 1

A.

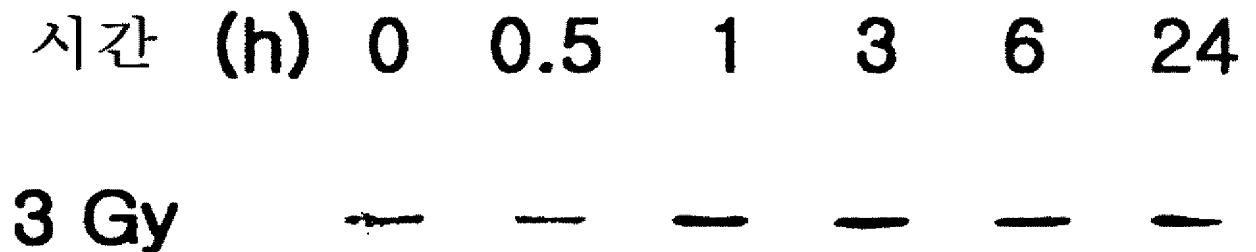


B.

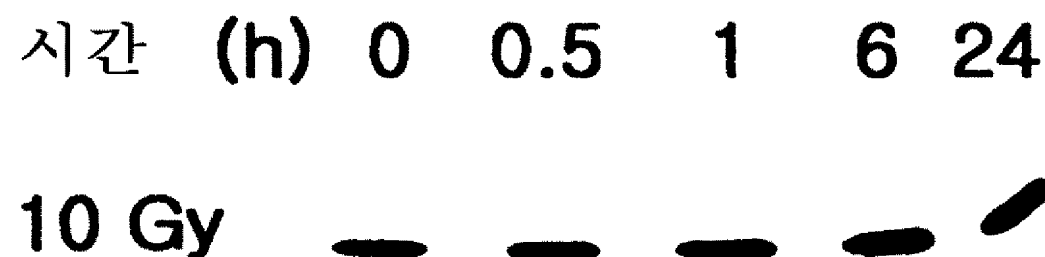
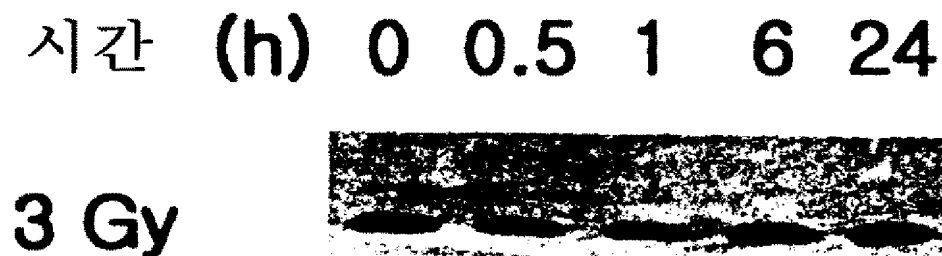


도면 2

A. UMSCC-11A

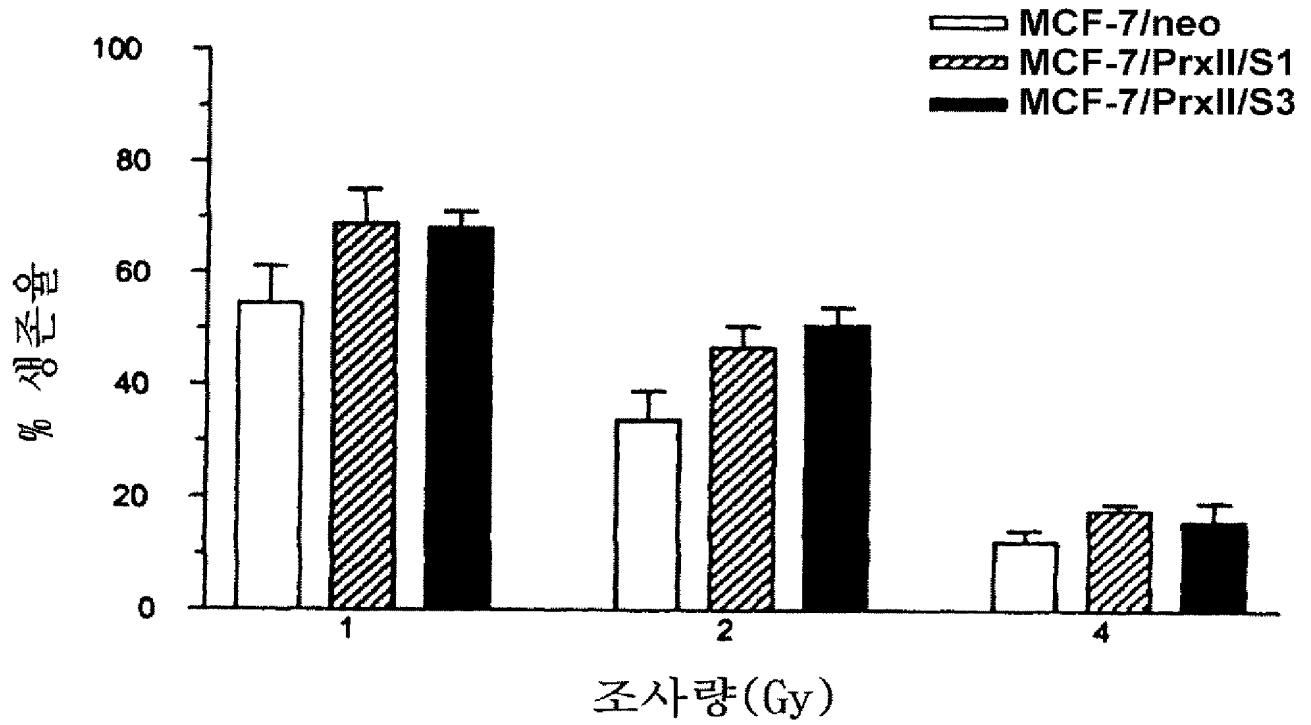


B. MCF-7

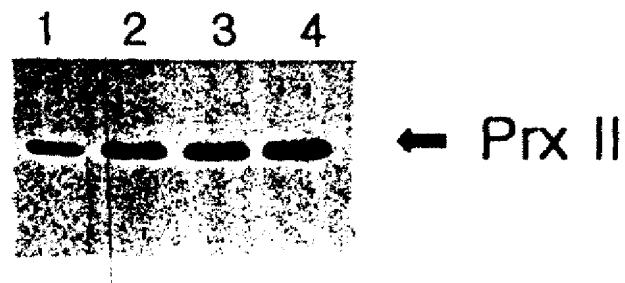


도면 3

A.

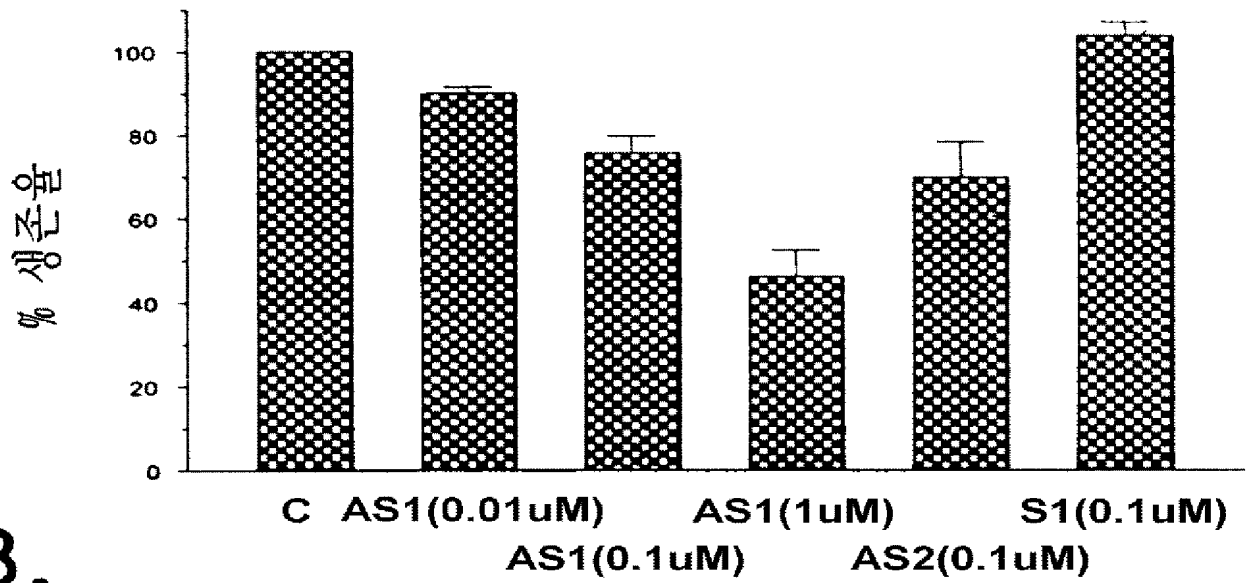


B.

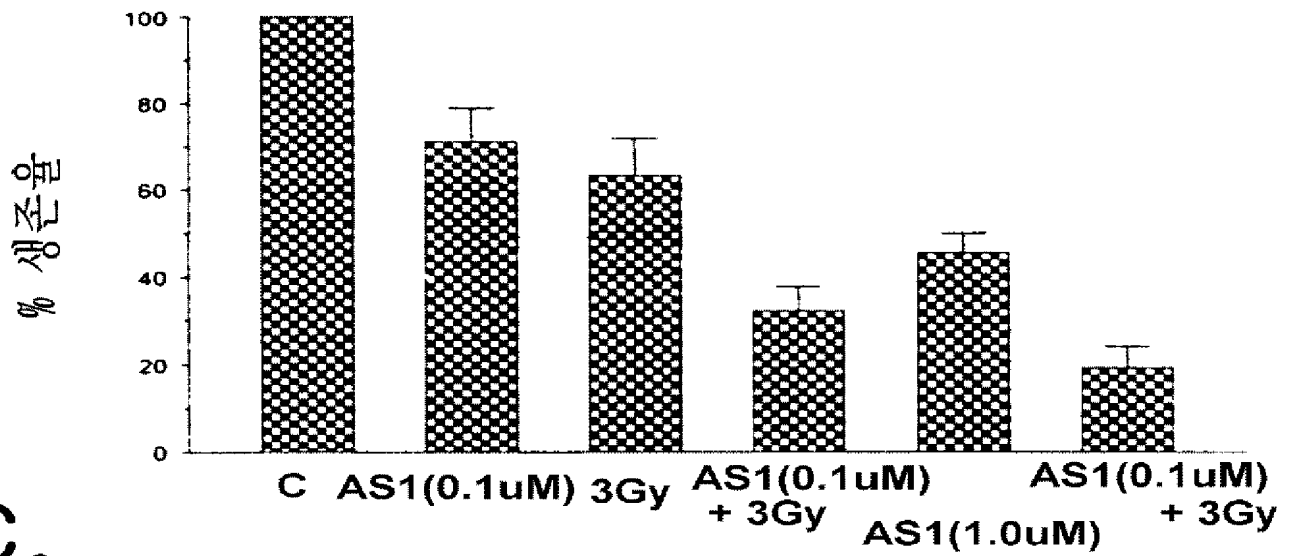


도면 4

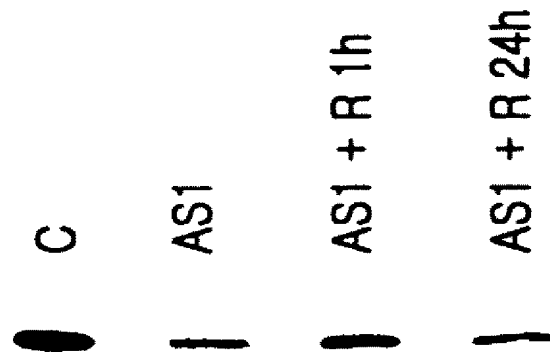
A.



B.



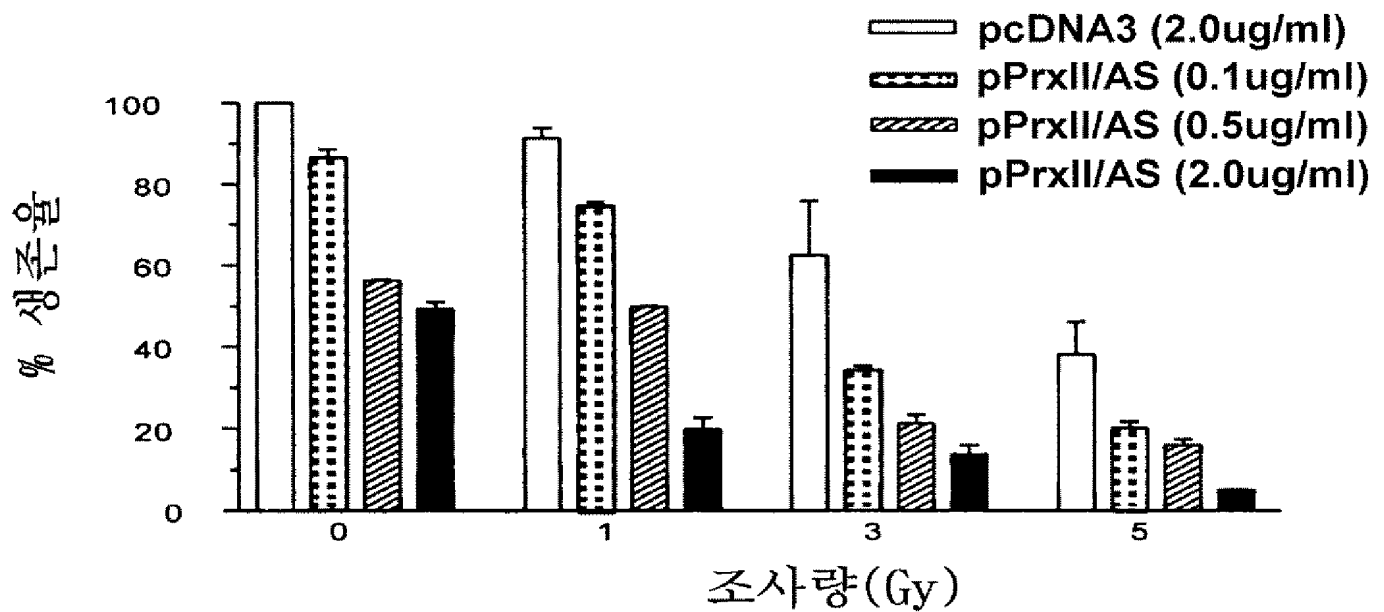
C.



도면 5

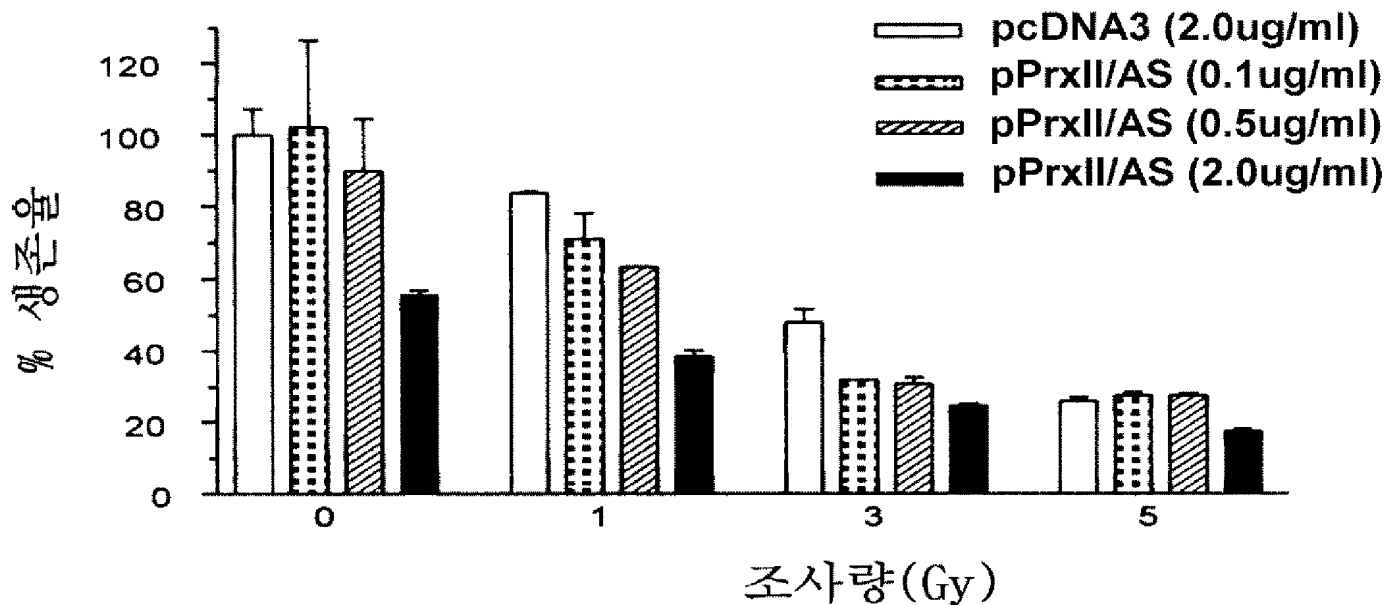
5A.

UMSCC-11A

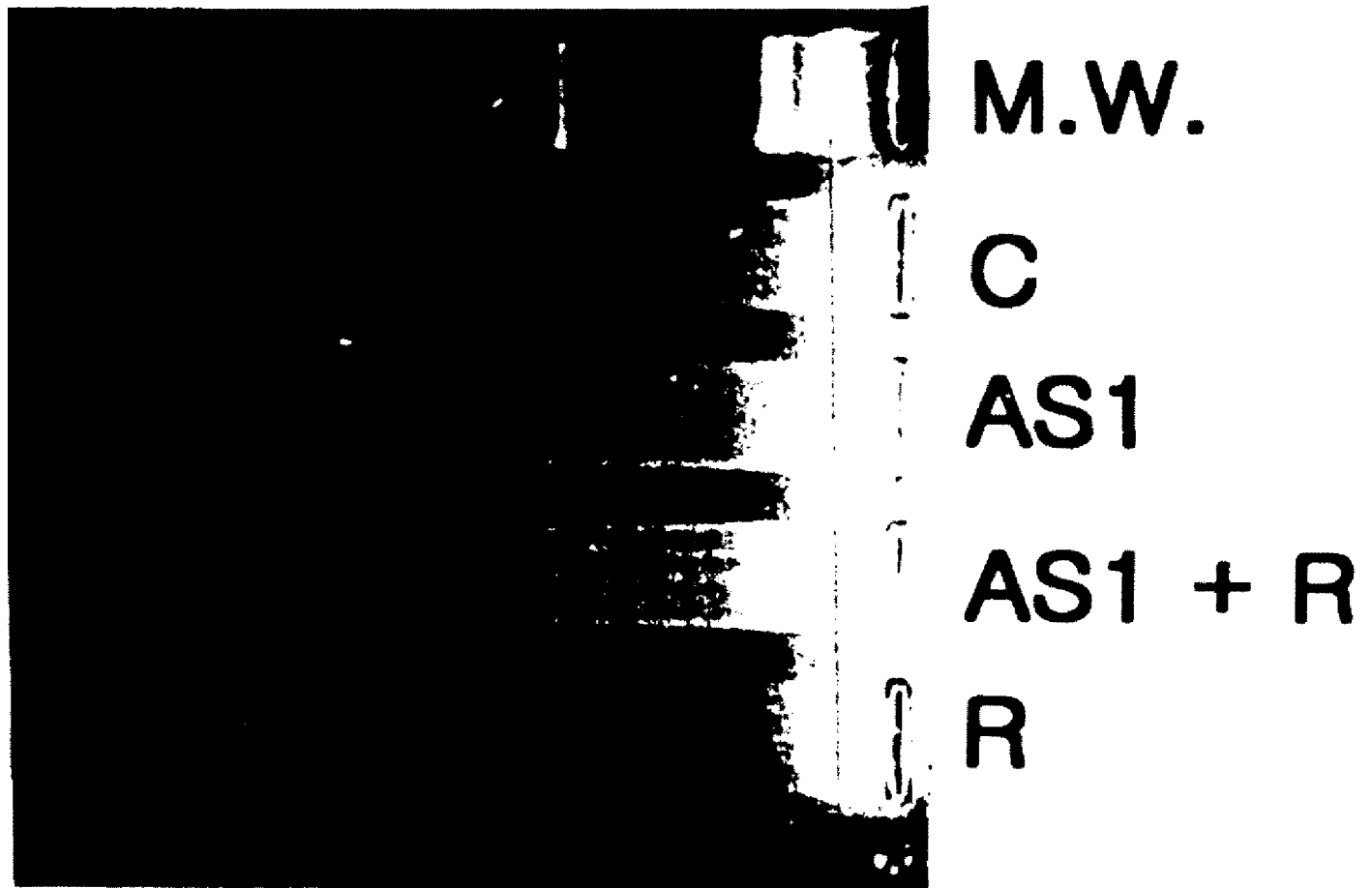


5B.

MCF-7



도면 6



<110> Korea Atomic Energy Research Institute
 <120> Radiation sensitizer comprising human peroxiredoxin II antisense
 sequence
 <130> PC00-0001
 <160> 6
 <170> KOPATIN 1.5
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic primer
 <400> 1
 tagcctttgc ccacgcagct
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic primer

20

```

<400>      2
tccgtagcc agcctaattg                                20
<210>      3
<211>      20
<212>      DNA
<213>      Artificial Sequence
<220>
<223>      oligomer
<400>      3
cgcgcggttac cggaggccat                                20
<210>      4
<211>      20
<212>      DNA
<213>      Artificial Sequence
<220>
<223>      oligomer
<400>      4
acgcgtaat cctcagacaa                                20
<210>      5
<211>      20
<212>      DNA
<213>      Artificial Sequence
<220>
<223>      oligomer
<400>      5
atggcctccg gtaacgcgcg                                20
<210>      6
<211>      1008
<212>      DNA
<213>      prx II gene sequence
<400>      6
ctggagttag gccctcgat cggccccgcc ggggtcggcc caccggcctg gggagcgct      60
gagaacgcgg gtccacgcgt gtgatcgcc gtgcgtctag ctttgccca cgcagcttcc      120
agtcatggcc tccggtaacg cgcgcacgga aaagccagcc cctgacttca aggccacagc      180
ggtggttgat ggcgccctca aagaggtgaa gctgtcggac tacaaagga agtacgtggt      240
cctctttttc taccctctgg acttcacttt tgtgtgcccc accgagatca tcgcgttcag      300
caaccgtgca gaggacttcc gcaagctggg ctgtgaagtg ctgggcgtct cgggtggactc      360
tcagttcaac cacctggcct ggatcaacac ccccggaag gagggaggat tggggccctc      420
gaacatcccc ctgcttggtg acgtgaccag acgcttgtct gaggattacg gcgtgctgaa      480
aacagatgag ggcattgcct acaggggcct ctttatcatc gatggcaagg gtgtccttcg      540
ccagatcact gttaatgatt tgccctgtgg acgctccgtg gatgaggctc tgccgctggt      600
ccaggccttc cagtacacag acgagcatgg ggaagtttgt cccgctggct ggaagcctgg      660
cagtgcacag attaagccca acgtggatga cagcaaggaa tatttctcca aacacaatta      720
ggctggctaa cggatagtga gcttgtgccc ctgcctaggt gcctgtgctg ggtgtccacc      780
tgtgccccca cctgggtgcc ctatgctgac ccaggaaagg gcagacctgc ccttccaaac      840
tccacaagta tgggacctg gaggggtagg gcaagggcct tctcaatgcc tccacctaga      900
agttgaattg tgaggcctcc cccaagccca acccaggcgg acaaaaggcc tagaggtaac      960
aataaagtat tagggaaagg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa      1008

```